Quantitative und qualitative Untersuchungen interferierender und Interferon-induzierender Aktivitäten von Adenovirus 9 - 15 durch physikalische und chemische Behandlung

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Ingo Budiman

Saarbrücken

1973

1974

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr.med. Dr.phil. W. Zimmermann

Quantitative und qualitative Untersuchungen interferierender und Interferon-induzierender Aktivitäten von Adenovirus 9 - 15 durch physikalische und chemische Behandlung

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1973

vorgelegt von
Ingo Budiman
geb. am 21.11.1937
in Medan, Indonesien

Dekan: Prof. Dr. med. G. A. Jutzler
Referent: Prof. Dr. med. R. Wigand

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 21. Februar 1974 abgelegt

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Adenoviren	1
1.2.	Virusinterferenz	4
1.3.	Interferon und Interferoninduktoren	5
2.	Vorhaben und Versuchsanordnung	7
3.	Material und Methodik	8
3.1.	Material	8
3.2.	Virusvermehrung	9
3.3.	Bestimmung des Infektionstiters	10
3.4.	Bestimmung der Interferon-induzierenden Aktivität	11
3.5.	Quantitative Bestimmung des Interferons	11
3.6.	Bestimmung des Interferenztiters	11
3.7.	Hämagglutination	12
3.8.	Hitze-Inaktivierung des Adenovirus 9-15	12
3.9.	Behandlung des Adenovirus mit Chemikalien	13
3.10.	Behandlung des Adenovirus mit Trypsin	13
4.	Ergebnisse	
4.1.	Interferierende Aktivität von verschiedenen Adenoviren in der Hühnerfibroblasten (HF) - Kultur	14
4.2.	Zeitliche Abhängigkeit des Interferenztiters und des Titers des Interferoninduktors von Adenovirus 9-15	15
4.3.	Hitze-Inaktivierung	17
4.4.	Kinetik der Hitze-Inaktivierung von Adenovirus 9-15 bei 50 °C	18
4.5.	Qualitative Bestimmung der Empfindlichkeit der beiden Aktivitäten gegenüber verschiedenen Substanzen	19
4.6.	Die Wirkung von Harnstoff in verschiedenen Konzentrationen	20
4.7.	Die Wirkung von Guanidin in verschiedenen Konzentrationen	21
4.8.	Die Wirkung von 2-Mercaptoäthanol in verschiedenen Konzentrationen	22
4.9.	Die quantitative Bestimmung der Trypsin-Empfindlichkeit von Adenovirus 9-15	23
5.	Diskussion	24
6.	Zusammenfassung	28
7.	Literatur	29
8.	Danksagung	35

1. Einleitung

1.1. Adenoviren:

Die Adenoviren bilden eine große, bei Menschen und Tieren weit verbreitete Virusgruppe. Sie rufen beim Menschen vorwiegend akute Luftweginfekte und Augensymptome hervor. Im Jahre 1953 wurden ihre ersten Vertreter von Rowe u. Mitarbeitern (49) aus exzidierten Tonsillen isoliert. Unabhängig davon berichteten Hilleman u. Werner (24) über ihre erste Isolierung von Adenoviren.

Diese Gruppe von Viren umfaßt bisher beim Menschen 31 Typen, die serologisch voneinander differenzierbar sind. Inzwischen sind einige intermediäre Typen gefunden worden, welche von Wigand u. Mitarbeitern eingehend untersucht wurden (59,64). Das bekannteste unter diesen ist das Adenovirus vom Typ 9-15, welches wir in der Untersuchung als Modellvirus verwendet haben.

Die Adenoviren sind außerhalb der Wirtszellen nicht vermehrungsfähig. Sie sind durch bakteriendichte Filter filtrierbar, und resistent gegenüber den bisher bekannte Antibiotika. Außerdem sind sie resistent gegenüber Äther, und relativ unempfindlich gegen pH-Änderung, jedoch recht empfindlich gegen Hitze und UV-Bestrahlung.

Die Adenoviren sind 70-80 mμ große Partikel mit regelmäßiger Struktur. Der Innenkörper enthält DNS als Virusnukleinsäure. Die Proteinhaltige Außenschicht ist von Ikosaederstruktur (20 Flächen, 12 Ecken). Diese besteht aus 252 Kapsomeren, wobei 240 Kapsomeren dem Hexon-, und 12 endständige Kapsomeren und ihre Fortsätze dem Penton-Antigen entsprechen.

Die Struktur der Adenoviren und ihrer löslichen Antigene, die serologische Spezifität und die Beziehung der verschiedenen Typen zueinander wurden weitgehend untersucht und aufgeklärt (10,14,15,16,17,43,44,45,51, 55,56,59,60). Die eigenschaften der Hämagglutinine verschiedener Adenovirentypen wurden von der Gruppe um Wigand eingehend charakterisiert (2,3,4,5,8,47,61,63, 64,65,66). Als Viruskomponenten wurden sowohl vom Virus abtrennbare virusspezifische Antigene wie auch die kompletten und inkompletten Viruspartikel selbst bezeichnet.

a) Dodecon = lösliches Hämagglutinin
   Das lösliche Hämagglutinin erscheint wie ein sternförmiges Gebilde mit einem Durchmesser vom 450 bis 600 Å. Es besteht aus 12 kapsomerenartigen Untereinheiten mit stabförmigen Fortsätzen.
b) Fiberantigen = indirektes Hämagglutinin oder typenspezifisches Antigen
   Das typenspezifische Antigen hat eine faserförmige Struktur mit einer Verdickung am Faserende. Fiberantigen ist nachweisbar durch indirekte Hämagglutination mit einem geeigneten heterologen Adenovirus-Immunserum.
c) Hexon = gruppenspezifisches Antigen
   Das Hexon besteht aus freien Kapsomeren, in denen sich ein Hohlraum befindet.
d) Penton: Unter Penton versteht man den Komplex aus Scheitelkapsomeren und Fortsätzen der Adenoviren. Man weißt ferner, daß die lösliche Hämagglutinine aus Aggregaten mehrerer Pentons bestehen. Damit ergibt sich aus der Hämagglutination ein Maß für aggregierte Pentonkomponenten.

Die Züchtung der Adenoviren gelingt im allgemeinen nur in den empfindlichen Wirtszellen der gleichen Spezies, von der das Virus isoliert ist. Nach der Art des cytopathischen Effektes (CPE) unterscheiden sich die Adenoviren von anderen Virusgruppen. Als charakteristisch wurde von Rowe u. Mitarbeitern 1955 (50) das Auftreten großer, im Haufen gelagerter Rundzellen beschrieben. Später hatten Wigand und Bauer (62) festgestellt, daß in der Ausprägung des CPE zwischen den Virustypen charakteristische Unterschiede bestehen. Eine Anzahl von Typen verursacht neben der Rundzellbildung Retraktionen, während bei anderen lediglich isolierte Rundzellen ohne Klumpenbildung auftreten. Wenige Typen (Typ 12, 18 und 31) zeigen eine fein granuläre Art des CPE.
Die beim Menschen vorkommenden Adenoviren werden nach Art der Hämagglutination in vier Gruppen eingeteilt (Tab.1). Gruppe I agglutiniert Rhesusaffenerythrozyten, Gruppe II Rattenerythrozyten mit vollständigem Sedimentationsbild, und Gruppe III mit unvollständigem Sedimentationsbild. Gruppe IV ist ohne Hämagglutination. Die 31 Typen wurden nach ihrer Antigenspezifität im Neutralisations- und Hämagglutinationshemmungstest eingeteilt. Die entsprechenden Typen sind in Tab. 1 dargestellt.

Gruppe	Typen	Hämagglutination mit	Ausprägung des cytopathischen Effektes
I	3,4,7,11 14,16,21	Affenblutkörperchen	Retraktionen
II	8,9,10,13, 15,17,19, 22,23,24, 26,27,29, 30	Rattenblutkörperchen mit vollständigem Sedimentationsbild, auch Menschenblut der Gr.O (unterstreichend)	Rundzellen (außer 8)
	20,25,28	schwach	
III	1,2,5,6,	Rattenblutkörperchen mit unvollständigem Sedimentationsbild	Retraktionen
IV	12,18,31	keine (außer 12)	granulär

Tab. 1. Gruppeneinteilung der Adenoviren

1.2. Virusinterferenz

Die Interferenzerscheinung war schon vor mehr als 30 Jahren bekannt. Als erster beobachtete Hoskins im Jahre 1935 (29), daß das neurotrope Gelbfieber-Virus die Infektion desselben Virus vom viscerotropen Typ hemmte. Magrassi (40a) berichtete über eine konkurrierende Hemmung zwischen Herpes simplex-Virus von encephalogenen und nicht-encephalogenen Typen. Zu der Zeit konnte noch nicht festgestellt werden, ob dieses Hemmungsphänomen zweier Viren durch eine spezifische immunologische Reaktion des Organismus oder durch einen viralen Hemmungseffekt selbst hervorgerufen war.

Zwei Jahre später machten Findlay und MacCallum die Feststellung (13), daß auch ein viraler Hemmungseffekt durch zwei serologisch nicht verwandte Viren zu beobachten war. In den folgenden Jahren konnten Interferenzerscheinung auch am Hühnerembryo (20) und in der Gewebekultur (53) gezeigt werden. Zahlreiche quantitative und qualitative Versuche wurden sowohl in Tierversuch als auch in vitro unternommen, um die virale Interferenz näher zu studieren (19,21,22,23,3053). 1943 fanden Henle u. Henle (20), daß durch Hitze- oder UV-inaktivierte Viren noch in der Lage sind, Interferenzerscheinungen hervorzurufen. 1957 machten Isaacs u. Lindenmann (32) Versuche über Interferenz mit inaktivierten und aktiven Influenzaviren, deren Ergebnisse zu der Entdeckung von Interferon führten.

1.3. Interferon und Interferoninduktoren:

Während es über die virale Interferenz noch weiterer Untersuchungen bedarf, sind die molekular-biologischen Eigenschaften der Interferone schon weitgehend geklärt worden (33,38). Es sind Eiweißkomponenten aus tierischen Zellen, welche durch verschiedene stimulierende Substanzen aus der Zellen freigesetzt oder in den Zellen synthetisiert und dann freigesetzt werden. Interferon verursacht eine Resistenz der Zellen der gleichen Spezies gegenüber Virusinfektionen, Die antivirale Eigenschaft des Interferons ist unter anderem abhängig von seiner Konzentration (1,58), von den Bebrütungsbedingungen der Zellen mit Interferon (36,38), und von der Menge der superinfizierenden Virus (25). Seine antivirale Wirkung zeigt sich in der Hemmung der Synthese von viraler RNS und DNS (12,26,39, 41), und von Virus-Proteinen (8,34,37).

Interferon beeinflußt nicht die Adsorption des superinfizierenden Virus an die Zellen (27,31,57,58). Alle bisher bekannte DNS- und RNS-Virusgruppen können eine Interferonbildung induzieren. Auch Rickettien, Bakterien und Protozon sowie so heterogene Substanzen wie bakterielle Endotoxine, Statolon, Helenin und doppelsträngige Ribonukleinsäure gehören zu den Interferoninduktoren.
Bei Adenoviren scheint das Interferon die Hauptrolle für die virusbedingte Interferenz zu spielen (6,7,18 28,35,42). Eingehende Untersuchungen über andere Mechanismen der Interferenz liegen allerdings noch nicht vor. Von Bedeutung ist die Feststellung, daß nach Untersuchung von Ho u. Köhler (28) nur die infektiösen Viruspartikel selbst zur Interferenz und Interferoninduktion in der Lage sind, nicht jedoch die vom Viruspartikel abtrennbaren Komponenten, die sog. löslichen Antigene.

2. Vorhaben und Versuchsanordnung

In Vorversuchen hat sich ein System bestehend aus Hühnerfibroblasten als Zellkultur, Adenoviren als interferierendem Agens und Vesikulär-Stomatitis-Virus (VSV) als Indikatorvirus als geeignet erwiesen. Zur Charakterisierung der interferierenden und Interferon-induzierenden Eigenschaft war es erforderlich, die folgenden Fragen zu klären:

1. Abhängigkeit der genannten Aktivitäten von Virustyp,
2. Beziehung zwischen Virustiter, Interferenztiter und Titer des Interferon-Induktors,
3. Abhängigkeit von Interferenz und Interferon-Induktion von der Zeit nach Virusinokulation,
4. Physikalische und chemische Behandlung des Virus,
5. Behandlung des Virus mit Trypsin

Aus den letzten beiden Versuchsanordnungen sollten sich Anhaltspunkten für die chemische Natur der für die beiden Phänomene verantwortlichen Viruskomponenten ergeben.

3. Material und Methodik:

3.1. Material:

Enzyme

Trypsin, 6,25 Willstätter-Einheiten pro mg
(Novo Industrie GmbH., Mainz)
Chymotrypsin (Serva)
Lipase, aus Aspergillus cryzae (Serva)
Trypsin-Inhibitor (Novo)

Trisgepufferte NaCl-Lösung:

0,1 N Tris (hydroxymethyl-aminomethan) wurde mit 0,1 N HCl auf pH 7,2 eingestellt. Die Lösung wurde dann mit 0,85 %iger NaCl-Lösung 1:4 verdünnt.

Nährlösungen:

Eagle'sches Basalmedium diente als Erhaltungsmedium. Als Wachstumsmedium wurde Eagle'sches Medium mit 10 % inaktiviertem Kälberserum verwendet.

Zellkulturen:

Hühnerfibroblasten-Kultur wurde nach Shu (54) hergestellt.
HeLa-Zellkultur: Der HeLa-Zellstamm wurde uns von Frau Prof. Dr. E. Esser, Saarbrücken, zur Verfügung gestellt und bei uns auf Roux-Flaschen weiter gezüchtet.

Viren:

Die Adenovirus-Prototypen der Typen 1, 2, 3, 4, 5, 9, 15, 19, und 9-15, passiert in HeLa-Zellen.
Vesikulär-Stomatitis-Virus: Hühnerfibroblasten-adaptiertes Vesikulär-Stomatitis-Virus, Stamm Indiana.

3.2. Methodik:

1. Virusvermehrung

a). Adenoviren

Die Adenoviren wurden in Zellkulturen gezüchtet. Die Impfvirusmenge wurde so bemessen, daß sich am 1. Tag nach Inokulation ein unvollständiger (3-4), am 2. Tag ein vollständiger cytopathischer Effekt (4^+) zeigen sollte. Während der 3-stündigen Adsorptionszeit bei 37 °C wurde die beimpfte Zellkultur etwa alle 15 Minuten einmal geschwenkt zum Zweck einer gleichmäßigen Adsorption des Virus. Nach der Adsorption wurde das Medium ohne Zusatz vom Kälberserum als Erhaltungsmedium zugegeben. Die Zellkultur wurde sodann weiter bei 37 °C inkubiert. Gewöhnlich wurde das Virus nach 3 Tagen geerntet. Die Kultur wurde geschüttelt, um die infizierten HeLa-Zellen, die noch an der Glaswand hafteten, in Suspension zu bringen. Anschließend wurde die Zellsuspension in einen Zylinder gesammelt, und bei 4 °C sedimentieren lassen. Der Überstand wurde später entfernt, die Zellen in ca. 1/20 Volumen suspendiert und durch dreimaliges Einfrieren bei -20 °C und Wiederauftauen zum Platzen gebracht, um so das Virus in die Flüssigkeit gelangen zu lassen. Anschließend wurde bei ca. 3000 U./Min. 20 Minuten zentrifugiert. Der klare Überstand, in dem die Viren enthalten sind, wurde dann frei von Zellmassen suspipettiert, in sterile Schraubfläschen abgefüllt und bei -20 °C aufbewahrt. Von dem Überstand wurde eine Sterilitätsprobe auf einer Blutagarplatte durchgeführt.

b). Vesikulär-Stomatitis-Virus (VSV)
Das Vesikulär-Stomatitis-Virus wurde in Hühner=fibroblasten-Zellkulturen gezüchtet. Das Virus hatte zuerst in Hühnerfibroblasten-Kulturröhrchen jeweils mit stark verdünnter Virusmenge zwei Passagen durchlaufen. Dann wurde die Hühnerfibro=blasten-Zellkultur in einer Rouxflasche mit 0,1 ml des Virus von der zweiten Passage verimpft, und bei 37 °C inkubiert. Zur Ernte wurde der Überstand gesammelt, bei 3000 U./Min. 20 Minuten zentrifugiert und in kleinen Schraubfläschen abgefüllt. Das Virus wurde bei -70 °C aufbewahrt.

2. Bestimmung des Infektionstiters

a). von Adenoviren:
Infektiöses Adenovirus wurde 4-fach stufenweise mit Earle´schem Basalmedium verdünnt und in Volumina von 0,2 ml auf je zwei HeLa-Kulturröhrchen verimpft. Nach Inokulation wurden diese bei 37 °C inkubiert. Täglich wurde das Ausmaß des cytopathischen Effektes beobachtet und notiert. Die Endablesung erfolgte am 3. Tag nach Infektion. Die höchste Verdünnungsstufe, bei der die Zellen einen 50 %igen cytopathischen Effekt (CPE_{50}) zeigten, wurde als Maß für den Titer genommen.

b). von Vesikulär-Stomatitis-Virus (VSV)
Die Titerbestimmung des Vesikulär-Stomatitis-Virus (VSV) wurde in Hühnerfibroblasten-Zellkulturen vorgenommen. Diese wurde mit VSV in einer Verdünnungs=reihe mit dem Faktor 10 und je Verdünnung 6 Röhrchen=kulturen verimpft. Diese Kulturröhrchen wurden bei 37 °C inkubiert und das zeitliche Auftreten des cytopathischen Effektes im Protikoll festgehalten. Die endgültige Ablesung nahmen wir am 3. Tag nach Infektion vor. Die höchste Verdünnungsstufe, bei der 50 % der Zellkultur CPE zeigte, wurde als Maß für den Titer genommen. Die Titerberechnung erfolgte nach der Methode von Reed u. Muench.

3. Bestimmung der Interferon-induzierenden Aktivität von Adenovirus 9-15

Infektiöses oder inaktiviertes Adenovirus vom Typ 9-15 wurde 2-fach stufenweise mit Eagle'schem Basalmedium verdünnt und davon 0,1 ml auf je zwei Hühnerfibroblasten-Kulturröhrchen verimpft. Nach 24 Stunden bei 37 °C wurden die Überstände der Verdünnung in mit Gummistopfen verschlossenen Röhrchen gesammelt und in Wasserbad bei 56 °C für 3 Stunden erhitzt, um das in Überstände vorhandene Virus zu inaktivieren. Die unverdünnten Überstände wurden nach dem Vorhandensein von Interferon untersucht.

4. Quantitative Bestimmung des Interferons

Die gesammelten, im Wasserbad bei 56 °C behandelten Überstände wurden 2-fach stufenweise mit Eagle'schem Basalmedium verdünnt und in Volumina von 1,0 ml auf je zwei Hühnerfibroblasten-Kulturröhrchen inokuliert. Nach 24 Stunden bei 37 °C wurde der Überstand abgegossen und die Zellkultur mit 1 ml VSV (1000 $TCID_{50}$) infiziert, danach bei 37 °C inkubiert. Die höchste Verdünnungsstufe der Überstände, die nach 48 Stunden noch 50 % des CPE hemmt, wurde als Interferontiter festgelegt.

5. Bestimmung des Interferenztiters

Infektiöses oder inaktiviertes Adenovirus vom Typ 9-15 wurde 2-fach stufenweise mit Eagle'schem Basalmedium verdünnt und in Volumina von 0,1 ml auf je zwei Hühnerfibroblasten-Kulturröhrchen verimpft. Nach 24-stündiger Bebrütung bei 37 °C wurde das Medium abgegossen und die Zellkultur mit Eagle'schem Medium gewaschen. Die Superinfektion mit VSV erfolgte anschließend mit 1000 $TCID_{50}$. Die höchste Verdünnungsstufe, die nach 48-stündiger Bebrütung bei 37 °C noch 50 % des CPE hemmt, wurde als Titer der Interferenz festgelegt.

6). Hämagglutination

In jeder sphärischer Vertiefung der Hämagglutinationsplatte aus Plexiglas wurde als Vorlage 0,4 ml McIlvaine gepufferte 0,9 %ige Kochsalzlösung (pH 7,2) gegeben. Dann wurde 0,4 ml des Virusmaterials in die erste Vertiefung gegeben und gut vermischt. Es wurde nacheinander 0,4 ml des Virusgemisches in die nächste Vertiefung pipettiert. Somit wurde eine Virusverdünnungsreihe mit dem Faktor 2 hergestellt. Zu jeder Virusverdünnung wurde 0,2 ml 2 %igem Rattenblutkörperchen mit Zusatz von 0,5 %igem bei 56 °C 30 Minuten lang inaktiviertem Kanninchen-Normalserum (Endkonzentration) gegeben und gut vermischt. Die Ablesung des Sedimentationsbildes erfolgte 60 Minuten nach ruhigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur. Diejenige Verdünnungsstufe, bei der 50 % des Rattenblutkörperchen agglutinierte, wurde als Titer des Hämagglutinins abgelesen.

7). Hitze-Inaktivierung des Adenovirus

Das Virus wurde vor der Inaktivierung in den Brutschrank bei 37 °C gestellt. Auch die Metallröhrchen wurden im Wasserbad auf die gewünschten Temperaturen gebracht. Das Wasserbad ist elektrisch geheizt und wird thermostatisch geregelt. Etwa 1,2 ml der unverdünnten Virusproben vom Typ 9-15 wurden in Metallröhrchen im Wasserbad gefüllt und die Zeit nitiert. Wenn die erwünschte Erhitzungsdauer erreicht war, wurde das Metallröhrchen samt Virusprobe aus dem Wasserbad genommen und sofort im kaltem Wasser gekühlt. Während der Erhitzung wird das Metallröhrchen ständig in zirkulärer Bewegung gehalten.

8. Behandlung des Adenovirus mit Chemikalien

Das Virus wurde bei 4 °C mit verschiedenen Konzentrationen von Chemikalien bei geeignetem pH-Wert für 6 Stunden behandelt. Danach wurden die Chemikalien durch die Dialyse gegen tris-gepufferte NaCl-Lösung, pH 7,2, wieder entfernt.

9. Behandlung des Adenovirus mit Trypsin

Das Virus wurde vorher gegen Trispuffer, pH 8,0, bei 4 °C über Nacht dialysiert, und dann mit verschiedenen Konzentrationen von Trypsin, pH 8,0, bei 37 °C für eine Stunde behandelt. Die Trypsin-aktivität wird durch Zugabe von gleicher Menge Trypsininhibitor in Stillstand gebracht.

4. Ergebnisse

4.1. Interferierende Aktivität von verschiedenen Adenoviren in der Hühnerfibroblasten (HF)-Kultur

Tab. 2. Interferierende Aktivität verschiedener Adenoviren in HF-Kultur

Adenovirus Typ	CPE_{50}	HA-Titer	Interferenz-Titer
1	32	-	256
2	32	-	-
5	32	-	8
9	32	400	128
15	32	4000	64
19	32	600	32
9-15	32	1000	512

Tabelle 2 zeigt die interferierende Aktivität von verschiedenen Adenoviren in Hühnerfibroblasten-Kulturen. Der Infektionstiter beträgt bei allen Viren 32 CPE_{50}, während der HA-Titer gegenüber Rattenblutkörperchen äußerst unterschiedlich ist. Es zeigt sich, daß trotz gleichem Infektiositätstiter die verschiedenen Viren offenbar unterschiedliche interferierende Aktivität besitzen; eine Parallele zum HA-Titer besteht gleichfalls nicht. Typ 9-15 weist hohe interferierende Aktivität auf, deswegen wurde es als Modellvirus füe die weitere Untersuchungen verwendet.

4.2. Zeitliche Abhängigkeit des Interferenztiters und des Titers des Interferoninduktors von Adenovirus 9-15.

Zum Studium des Einfluß des Zeitfaktors auf die Entfaltung der interferierenden und der Interferon-induzierenden Aktivität wurde die mit Typ 9-15 infizierten HF-Kulturen in bestimmten Zeitabständen mit VSV superinfiziert bzw. ihre Überstände zum Nachweis von Interferon verarbeitet. Das Ergebnis ist in Abbildung 1 dargestellt.

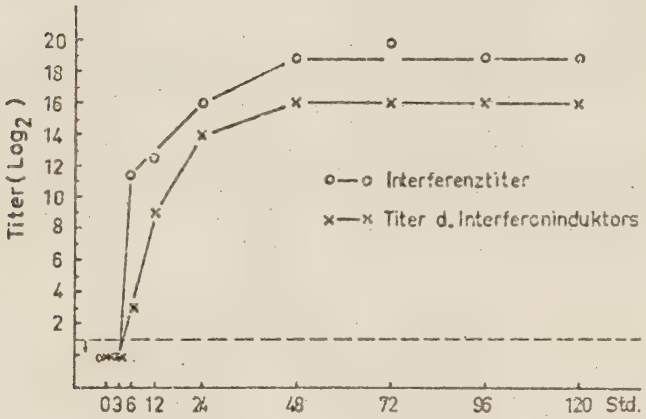

Abb.1. Zeitliche Abhängigkeit des Interferenztiters und des Titers des Interferoninduktors von Adenovirus 9-15. Abszisse: Zeit in Stunde nach Beimpfung mit Typ 9-15. Ordinate: Interferenztiter und Titer des Interferoninduktors in log 2 pro 0,1 ml.

Es handelt sich um eine ganze Gruppe von Zeitversuchen, bei denen jeweils eine Serie von Kulturen mit der in der Ordinate angegebenen Verdünnung von Adenovirus 9-15 beimpft wurde. Zu den in der Abszisse angegebenen Zeiten läßt sich dann durch Superinfektion mit VSV Interferenz bzw. im geernteten Überständen Interferon nachweisen. Aus den Kurven ist ersichtlich, daß von 0 bis 3 Stunden nach der Beimpfung mit Adenovirus 9-15 die interferierende und die interferoninduzierende Aktivitäten noch nicht nachweisbar sind. Bei 6 Stunden zeigt die interferierende Eigenschaft schon hohe Aktivität, während der Titer des Interferoninduktors noch ziemlich niedrig ist. Die Titerdifferenz liegt um 200 bis 300. Bei weitere Inkubation steigen die Titer beider Aktivitäten fast parallel an und erreichen ihre Maxima nach 48 Stunden. Danach bleiben die Titer unverändert. Von 24 Stunden an ist der Interferenztiter um etwa das 8-fache höher als der Titer des Interferon= induktors.

4.3. Hitze-Inaktivierung

Adenovirus 9-15 wurde bei pH 7,2 in einem Stahlröhrchen unter ständigem Schütteln bei einer Temperatur von 20 °C bis 56 °C im Wasserbad für eine Minute erhitzt. Anschließend wurde das Virus sofort mit kaltem Wasser gekühlt und auf seine vier Aktivitäten untersucht. Die Untersuchungsergebnisse sind in der Abb. 2 dargestellt.

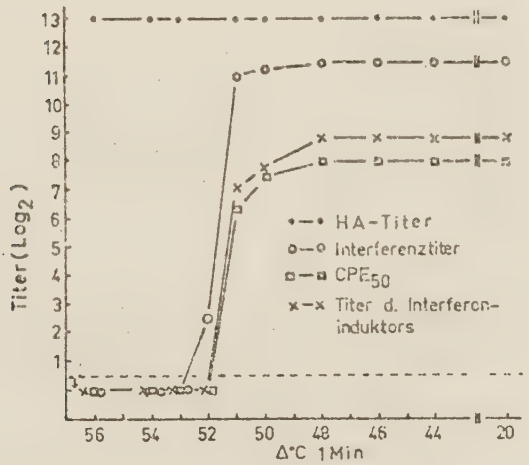

Abb. 2. Hitze-Inaktivierung von Adenovirus 9-15
Abszisse: Erhitzungstemperatur. Ordinate: Titer der Interferenz, des Interferoninduktors, der Infektiosität und der Hämagglutination.

Die hämagglutinierende Aktivität wird bis 56 °C nicht inaktiviert, während die übrigen drei Eigenschaften schon bei 53 °C nicht mehr nachweisbar sind.

4.4. Kinetik der Hitze-Inaktivierung von Adenovirus 9-15 bei 50 °C

Der Ablauf der Hitze-Inaktivierung bei 50 °C von 0 bis 8 Minuten ist in Abb. 3 dargestellt; mit Ausnahme der hämagglutinierenden Aktivität verlaufen die Inaktivierungskurven gleichsinnig.

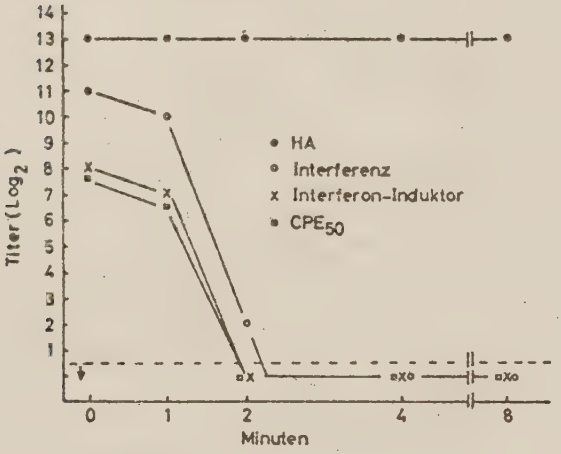

Abb. 3. Kinetik der Hitze-Inaktivierung von Adenovirus 9-15 bei 50 °C

4.5. Qualitative Bestimmung der Empfindlichkeit der beiden Aktivitäten gegenüber verschiedenen Substanzen

Die Wirkung einiger Chemikalien und Enzyme ist in der Tabelle 3 zusammengestellt. Das Virus wurde bei 4 °C 6 Stunden lang mit einer Reihe von Wirkstoffen, bzw. bei 37 °C eine Stunde mit Enzymen, bei dem gewünschten pH behandelt. Nach Dialyse gegen trisgepufferte NaCl-Lösung bzw. nach Zugabe von Enzyminhibitor wurde das vorbehandelte Virus auf seine vier Aktivitäten untersucht.

Substanze	pH	Zeit	Temp.	Titer von			
				CPE_{50}	HA	Interferenz	Interferon-Induktor
Guanidin 2,0 M	5,0	6Std	4°C	-	-	-	-
2-Mercaptoäthanol 2,0M	5,0	6Std	4°C	4	48	48	6
Kontrolle	5,0	6Std	4°C	1400	96000	6000	768
Harnstoff 4,0M	8,0	6Std	4°C	-	512	-	-
KIO_4 0,0073 M	8,0	6Std	4°C	1400	96000	4000	768
Lipase 0,04 %	8,0	1Std	37°C	1400	96000	4000	768
Trypsin 0,1 %	8,0	1Std	37°C	1400	6000	-	-
Chymotrypsin 0,1%	8,0	1Std	37°C	1400	6000	-	-
Kontrolle	8,0	1Std	37°C	1400	96000	6000	768

Tab. 3. Die Wirkung einiger Chemikalien und Enzyme

Die vier Aktivitäten sind gegenüber Kalium perjodat und Lipase resistent, werden aber durch Guanidin, Mercaptoäthanol und Harnstoff inaktiviert. Trypsin und Chymotrypsin haben eine selektive Wirkung. Während die interferierende und die Interferon-induzierende Eigenschaft durch die beiden Enzyme vollkommen inaktiviert werden, zeigt die Infektiosität keinen Titerabfall. Die HA-Aktivität ist nach der Behandlung auf etwa 1/15 abgesunken.

Weiterhin wurde eine quantitative Untersuchung unter Anwendung verschiedener Konzentrationen der in Tabelle 3 aufgeführten Stoffe unter sonst gleichen Versuchsbedingungen angeschlossen.

4.6. Die Wirkung von Harnstoff in verschiedenen Konzentrationen ist in der Abb. 4. dargestellt. Bei 2,0 Möl zeigt der Harnstoff keine nachweisbare Wirkung auf die vier Aktivitäten. Von 4,0 Mol an sind die Infektiosität, die interferierende und die Interferon-induzierende Aktivitäten nicht mehr nachweisbar, während sich die hämagglutinierende Aktivität etwas resistenter verhält. Sie ist bei 8,0 Mol noch festzustellen.

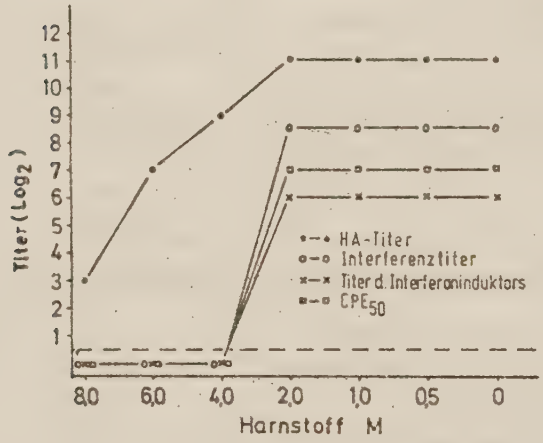

Abb. 4. Die Wirkung von Harnstoff (Behandlung: 6 Std. pH 5,0 bei 4 °C)

4.7. Die Wirkung von Guanidin in verschiedenen Konzentrationen ist in der Abb. 5. dargestellt. Guanidin hat keine Wirkung auf die vier Eigenschafteh bei einer Konzentration von 0,5 Mol. Bei 1,0 Mol vermindern sich die Aktivitäten um das 4- bis 6-fache. die interferierende, Interferon-induzierende Aktivitäten und die Infektiosität sind bei 2,0 Mol nicht mehr nachweisbar, während die hämagglutinierende Aktivität noch einen geringeren Titer aufweist.

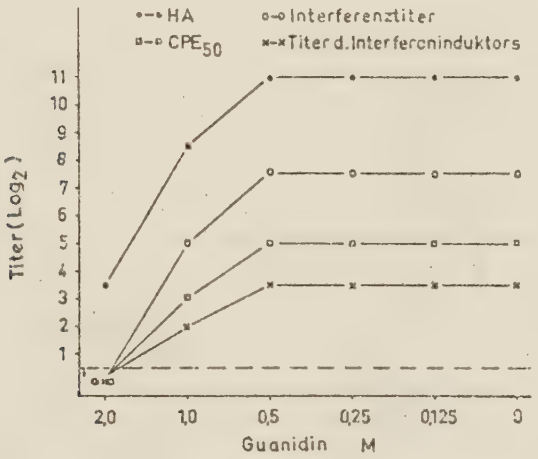

Abb. 5. Die Wirkung von Guanidin (Behandlung: 6 Std. pH 5,0 bei 4 °C)

4.8. Abb. 6 zeigt die Wirkung von 2-Mercaptoäthanol in verschiedenen Konzentrationen. 1,0 Mol Mercapto= äthanol hat keine Wirkung auf die vier Aktivitäten. Mit steigender Konzentration werden sie ziemlich gleichmäßig inaktiviert. Bei 4,0 Mol ist die Interferon-induzierende Aktivität und die Infektiosität nicht mehr nachweisbar, während die interferierende und die hämagglutinierende Aktivität noch vorhanden ist.

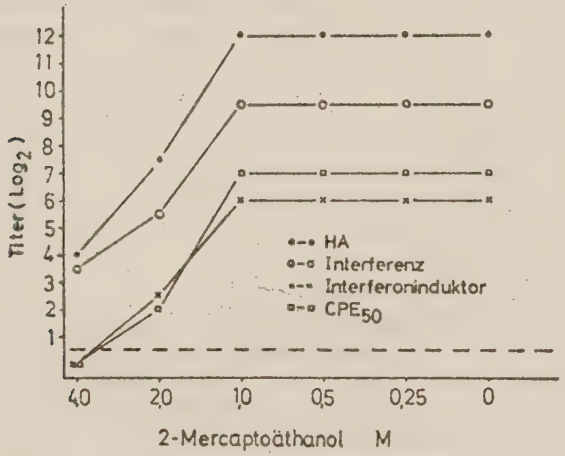

Abb. 6. Die Wirkung von 2-Mercaptoäthanol (Behandlung: 6 Std. pH 5,0 bei 4 °C)

4.9. Die quantitative Bestimmung der Trypsin-Empfindlichkeit von Adenovirus 9-15 ist in der Abb. 7 dargestellt. Bei einer Konzentration von 0,625 µg/ml hat Trypsin schon eine Wirkung auf die Aktivitäten mit Ausnahme der Infektiosität, bei 1,25 µg/ml ist die Interferon-induzierende und bei 5 µg/ml auch die interferierende Aktivität unter die nachweisbare Grenze gesunken, während die hämagglutinierende Eigenschaft eine möglicherweise biphasische Inaktivierung zeigt. Bei 0,625 bis 10µg/ml Trypsin weist die Kurve einen linearer Titerabfall der HA-Aktivität auf. Bei weiterer Erhöhung der Trypsinkonzentration bis 40 µg/ml wurde keine zusätzliche Inaktivierung festgestellt. Die HA-Aktivität in der 2. Phase ist gegenüber Trypsin resistent. Diese Verhalten dürfte sich durch das Vorkommen mehrerer hämagglutinierender Viruskomponenten (Dodecon, Virion und anderer) im Material erklären lassen. Die Infektiosität von Adenovirus 9-15 wird von Trypsin bis zu einer Konzentration von 40 µg/ml nicht inaktiviert.

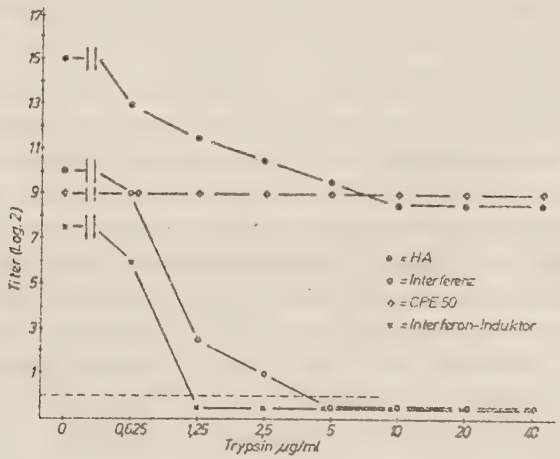

Abb. 7. Die Wirkung von Trypsin (Behandlung: 1 Std. pH 8,0 bei 37 °C)

Diskussion :

Die quantitative Bestimmung der interferierenden und Interferon-induzierenden Aktivität beruht auf dem Ausmaß der Wachstumshemmung des superinfizierenden Virus (9) bzw. auf der Höhe des induzierten Interferontiters (46). Bei früheren Versuchen stellte sich heraus, daß die Dosis der superinfizierenden VSV nur einen geringeren Einfluß ausübte; ebenfalls ist die Zeit von Superinfektion bzw. 24 und 48 Stunden, wie aus der Abb. 1 ersichtlich ist, ohne wesentlichen Einfluß.

Die kinetische Untersuchung der interferierenden Aktivität von Adenovirus 9-15 (s. Abb. 1) zeigt, daß sich diese Eigenschaft bereits 6 Stunden nach der Beimpfung in der Hühnerfibroblasten-Kultur entfaltet. Zu diesem Zeitpunkt ist der Titer des Interferoninduktors noch recht niedrig; er steigt aber noch während der Zeit, in der in permissiven Kulturen die Eklipse abläuft, stark an. Weiterhin verlaufen die Kurven der interferierenden und Interferon-induzierenden Eigenschaften einander parallel und erreichen ihre Maxima 48 Stunden nach Beimpfung.

Es ist anzunehmen, daß die Spätinterferenzerscheinung hauptsächlich durch die Wirkung des Interferons bedingt ist. So berichtete Markovits (40), daß die Interferenz durch Adenovirus 7 frühzeitig eintritt, Interferon dagegen erst einen Tag danach nachweisbar ist, was in Parallele zu unseren eigenen Beobachtungen steht. Aus diesen Beobachtungen ist zu vermuten, daß die interferierende und die Interferon-induzierende Eigenschaften von Adenovirus 9-15 möglicherweise [illegible] zwei selbstständigen Qualitäten sind.

Auf Grund der elektronenoptischen Untersuchungen scheint der Träger der hämagglutinierenden Aktivität bei Dodecon, Virion und Fiberantigen das morphologische Element der Faser mit endständigem Kopf zu sein. Nach eingehenden Untersuchungen an gereinigten Viruskomponenten des Adenovirus 19 von Ratanakrong u. Wigand (47) konnte eine unterschiedliche Stabilität der hämagglutinierenden Aktivität der Viruskomponenten gegenüber Hitze und einiger Chemikalien festgestellt werden. Es wurde berichtet, daß das Dodecon die labilste Komponente ist, während das Virion-Hämagglutinin sich stabiler verhält. Mit Ausnahme von Dodecon sind die Komponenten stets resistent gegen proteolytische Enzyme. Bei der Hämagglutination erfaßt man in erste Linie das Dodecon, ein Aggregat von 12 Pentoneinheiten (15,16), also eine vom infektiosen Partikel unterschiedliches Strukturelement, wenngleich auch die Viruspartikel selbst Rattenblutkörperchen agglutinieren.

Wie von Ho und Köhler (28) und in eigenen unveröffentlichten Versuchen gefunden wurde, besitzen bei Adenoviren nur die Viruspartikel selbst interferierende Aktivität, nicht dagegen virusfreie Überstände, in welchen sämtliche löslichen Antigene enthalten sind. Bei den physikalischen und chemischen Inaktivierungsversuchen ist es demnach nur sinnvoll, das Verhalten der Infektiosität mit dem der interferierenden und Interferon-induzierenden Aktivität zu vergleichen; ein abweichendes Verhalten des Hämagglutinins, mit dem überwiegend die Intaktheit des Dodecon gemessen wird, ist von sekundärer Bedeutung.

Bei der Untersuchung durch Erhitzung von gereinigtem Virion von Typ 5 auf 50 bis 53 °C wurde gezeigt (51), daß die Scheitelkapsomeren durch die fünf dem Scheitel benachbarten Hexonkapsomeren durch diese Behandlung herausgelöst werden. Wenn dieser Vorgang auch bei ungereinigtem Adenovirus 9-15 geschieht, wäre eine intakte Viruspartikel notwendig für die Interferenzerzeugung. Damit stehen unsere Befunde insofern im Einklang, als bei Erhitzung auf 53 °C neben der interferierenden und Interferon-induzierenden Aktivität gleichzeitig auch die Infektiosität erlischt, während die auf Dodecon zurückzuführende hämagglutinierende Aktivität noch erhalten bleibt.

Durch Einwirkung von Harnstoff oder Guanidin werden Wasserstoffbindungen von Proteinen gespalten; bei höherer Konzentration kann die Proteinschale des Virus denaturiert und die Nukleinsäure freigesetzt werden (11, 48, 52). Mercaptoäthanol wirkt dagegen durch Spaltung von Disulfidbindungen. Die interferierende und die Interferon-induzierende Eigenschaft von Adenovirus 9-15 werden durch die Behandlungen mit diesen drei Substanzen gleichsinnig mit der Infektiosität inaktiviert.

Die enzymatische Behandlung mit Trypsin und Chymotrypsin inaktiviert beide Eigenschaften vollständig, läßt dagegen die Infektiosität unbeeinflußt.

Die quantitative Untersuchung über die Trypsin-Empfindlichkeit verschiedenen Eigenschaften von Adenovirus 9-15, wie sie aus Abb. 7 ersichtlich ist, zeigte, daß die beiden Eigenschaften nicht mit dem Infektiosität identisch sind. Die Infektiosität wird bis zu 40 µg Trypsin / ml nicht inaktiviert, während die beiden Eigenschaften schon bei 5 µg nicht mehr nachweisbar sind.

Bermerkenswert ist der Kurvenverlauf der hämagglutinieren= den Eigenschaft. Wie in Abb. 7 zeigt, erfährt die hämagglu= tinierende Eigenschaft eine möglicherweise biphasische Inaktivierung. Bei 0,625 bis 10 µg/ml Trypsin weist die Kurve gleich stark empfindlich wie die beiden Eigenschaften einen linearer Titerabfall der HA-Aktivität auf. Bei weiterer Erhöhung der Trypsin-Konzentration wurde keine zusätzliche Inaktivierung festgestellt.

Nach Untersuchungen gereinigten Viruskomponenten von Typ 19 (47) verhält sich das Hämagglutinin von Kapsid und Virion völlig resistent gegenüber Trypsin, dagegen wurde Dodecon, das lösliche Hämagglutinin, bei schwacher Einwirkung partiell, bei starker vollständig inaktiviert. Da im Ausgangsmaterial unserer Versuche mehrere hämagglutinierende Viruskomponenten (Dodecon, Virion, usw.) vorkommen, dürfte die 1. Phase der biphasischen HA-Aktivität durch im Material vorhandenes Dodecon bedingt sein, während die 2. Phase auf trypsinresis= tentem Virion beruht.

Lengyel et al. (35) haben bei Adenovirus 8 in dem trypsin= empfindlichen Hämagglutinin (wahrscheinlich Pentonpartikel) eine Interferon-induzierende Aktivität nachgewiesen. Eben= falls haben Béládi und Pusztai (6) Penton als Interferon-induktor vermutet. Es ist zwar aus Untersuchungen an Typ 5 bekannt (55), daß Trypsin bei diesem Typ die Pentonbasis auflöst. Dennoch stehen die Befunde der ungarischen Autoren in einem bislang ungeklärten Widerspruch zu unseren Ergeb= nissen und denen von Ho und Köhler (28), wonach nur die Viruspartikel, nicht aber lösliche Antigene interferierende Eigenschaften haben. Es hat den Anschein, daß das Penton dem Viruspartikel seine interferierende Aktivität verleiht, diese aber für sich allein oder in den Dodecon-Komplexen nicht besitzt. Bei Herauslösung der Pentons aus dem Virion durch Trypsin geht somit die interferierende Aktivität verloren, während solche Partikel noch in der Lage sind, den Infektionsvorgang in der Zellen in Gang zu setzen.

Zusammenfassung

Die interferierende und die Interferon-induzierende Eigenschaft von Adenoviren wurden qualitativ und quantitativ in Hühnerfibroblasten-Zellkulturen nach einer neu erarbeiteten Titrationsmethode untersucht. Verschiedene Virustypen zeigen unterschiedlich starke interferierende Aktivität.

Mit einer Reihe physikalischer und chemischer Behandlungen wurde die Stabilität der interferierenden und Interferon-induzierenden Eigenschaft und der Infektiosität, vergleichsweise auch des löslichen Hämagglutinins untersucht. Die beiden erstgenannten Eigenschaften verhalten sich bei allen Behandlungen identisch; sie wurden durch Harnstoff, Guanidin, Mercaptoäthanol und Hitze unter den gleichen Bedingungen inaktiviert wie das infektiöse Virus; durch Trypsin und Chymotrypsin werden sie gleichfalls inaktiviert, während die Infektiosität hier stabil bleibt. Die Befunde lassen sich so deuten, daß die im Virion eingebaute Pentonkomponente der Träger der interferierenden Aktivität ist.

In Zeitversuchen war 6 Stunden nach Virusinokulation bereits eine sehr hohe interferierende Aktivität vorhanden, während die Interferon-induzierende Aktivität erst später anstieg. Möglicherweise gibt es in der frühen Phase der Infektion also andere Mechanismen der Interferenz neben der durch Interferon ausgelösten.

7. Literatur

1). Baron, S., C.E. Buckler, H.B. Levy, and R.M.Friedmann: Some factors affecting the interferon-induced antiviral state. Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.) 125, 1320-1326 (1967)

2). Bauer, H. and Wigand, R.: Heterogeneity of adenovirus haemagglutinins. Arch. f. Virusforsch. 12, 148-151 (1962)

3). Bauer, H. und Wigand, R.: Eigenschaften der Adenovirus-Hämagglutinine. Z. Hyg. 149, 96-113 (1963)

4). Bauer, H. und Wigand, R.: Vergleichende Untersuchungen an Hämagglutinine von Adenovirusstämmen der Gruppe I und II. Arch. f. Virusforsch. 21, 11-24 (1967)

5). Bauer, H., Wigand, R. und Adam, W.: Lösliche und virusgebundene Adenovirus-Hämagglutinine. Z. Naturforsch. 19b, 7 (1967)

6). Béládi, I. and R. Pusztai.: Interferon-like substance produced in chick fibroblast cells inoculated human adenovirus. Z. Naturforsch. 22b, 165-169 (1967)

7). Béládi, I., M. Bakay, R. Pusztai and G. Hidasi.: Induction of interferon in chick cells by adenoviruses of different origin. J. gen. Virol. 8, 143 (1970)

8). Bodo, G. and C. Jungwirth.: Effect of interferon on deoxyribonuclease induction in chick fibroblast cultures infected with Cowpox virus. J. Virol. 1, 446-471 (1967)

9). Bratt, M. A. and H. Rubin.: Specific interference among strains of Newcastle disease virus. I. Demonstration and measurement of the interference. Virology 33, 598 (1967)

10). Brenner, S., A.P. Waterson, and P. Wildy.: The icosahedral form of an adenovirus. J. mol. Biol. 1, 84-86 (1952)

11). Cooper, P. D.: Studies on the structure and function of the poliovirion: Effect of concentrated urea solutions. Virology 16, 63-70 (1962)

12). De Somer, P., A. Prinzie, P. Denys, JR., and E. Schonne.: Mechanism of action of interferon. I. Relationship with viral ribonucleic acid. Virology 16, 63-70 (1962)

13). Findlay, G. M., and F. O. MacCallum.: An interference phenomenon in relation to yellow fever and other viruses. J. Path. Bact. 44, 405-424 (1937)

14). Gelderblom, H., R. Wigand, and H. Bauer.: DEAE-chromatography of adenovirus of Rosen's Group II. Nature 205, 625-626 (1965)

15). Gelderblom, H., H. Bauer, H. Frank and R. Wigand.: The structure of group II adenoviruses. J. gen. Virol. 1, 553 (1967)

16). Gelderblom, H., W. Meiser, A. Lengyel, and R. Wigand.: The serological relationship of the soluble antigens of adenovirus type 19. J. gen. Virol. 2, 331-340 (1968)

17). Ginsberg, H.S., H.G. Pereira, R.C. Valentine, and W. C. Wilcox.: A proposed terminology for the adenovirus antigens and virion. Virology 28, 782 (1966)

18). Guenov, I.: Interference activity of animal adenoviruses in chick embryo cell cultures. Acta Virol. 14, 337 (1970)

19). Henle, W.: Interference phenomena between animal viruses: A review. J.Immunol. 64, 203-236 (1950)

20). Henle, W., and G. Henle.: Interference of inactive virus with the propagation of virus of influenza. Science 98, 87-89 (1943)

21). Henle, W., and G. Henle.: Interference between inactive and active viruses of influenza. 2. Factors influencing the phenomenon. Amer. J. med. Sci. 207, 717 (1944)

22). Henle, W., and G. Henle.: Interference between inactive and active viruses of influenza. 3. Cross-interference between variou related and unrelated viruses. Amer. J. med. Sci. 210, 362 (1945)

23). Henle, W., and G. Henle.: Interference between inactive and active viruses of influenza. 4. The nature of the interfering agent. Amer. J. med. Sci. 210, 369 (1945)

24). Hilleman, M. R. and Werner, J. H.: Recovery of a new agent from patients with acute respiratory illness. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 85, 183 (1954)

25). Ho, M.: Kinetic considerations of the inhibitory action of an interferon produced in chick cultures infected with sindbis virus. Virology 17, 262-275 (1962b)

26). Ho, M.: Effect of an interferon on synthesis of viral rironucleic acid and plaque formation. Proc. soc. Exp. Biol. 112, 511-513 (1963)

27). Ho, M., and J.F.Enders: An inhibitor of viral activity appearing in infected cell cultures. Proc. nat. Acad. Sci. 45, 385-389 (1959a)

28). Ho, M., and K. Köhler.: Studies on human adenoviruses as inducers of interferon in chick cells. Arch. Virusforsch. 22, 69-78 (1967)

29). Hoskins, M.: A protective action of neurotropic against viscerotropic yellow fever virus in Macacus rhesus. Amer. J. trop. Med. Hyg. 15, 675-680 (1935)

30). Isaacs, A.: Viral interference. Symp. Soc. gen. Microbiol. 9, 102-121 (1959)

31). Isaacs, A., D.C. Burke, and L. Fadeeva.: Effect of interferon on the growth of viruses on the chick chorion. Brit. J. exp. Path. 39, 447-451 (1958)

32). Isaacs, A. and J. Lindenmann.: Virus interference. I. The interferon. Proc. roy. Soc. B 147, 258-267 (1957)

33). Isaacs A., and J. Lindenmann.: Virus interference. II. Some properties of interferon. Proc. roy. Soc. B 147, 268-273 (1957)

34). Joklik, W. K. and T. C. Merigan.: Concerning the mechanism of action of interferon. Proc. nat. Acad. Sci. 56, 558-565 (1966)

35). Lengyel, A., I. Béládi, I. Nász, and R. Pusztai.: Adenovirus type 8 antigens and interferon induction. Zbl. Bakt. I. Orig. 210, 423 (1969)

36). Levine, S.: Persistence of active interferon in cells washed after treament with interferon. Proc. Soc. exp. Biol. 121, 1041-1045 (1966)

37). Levine,S.,W.E. Magee, R.D.Hamilton, and C.V. Miller.: Effect of interferon on early enzyme and viral DNA synthesis in vaccinia virus infection. Virology 82, 33-40 (1967)

38). Lindenmann,J.,D.Burke, and A. Isaacs.: Studies on the production, mode of action and properties of interferon. Brit. J. exp. Path. 38, 551-562 (1957)

39). Lockart,R.Z.,Jr., T.Sreevalsan, and B.Horn.: Inhibition of viral RNA synthesis by interferon. Virology 18, 493-494 (1962)

40a).Magrassi, F.: Studii sull'infezione e sull'immunitá di virus erpetico. II. Sul contenuto in virus del cervello, in rapporto a diversi ceppi di virus, a diverse vie d'infezione. a diversi fasi del processo infettivo. Z. Hyg. Infekt.-Kr. 117, 501-528 (1935)

40). Markovits, P.: Interférence et production d'interferon dans des cellules de poulet infectées par les Adénovirus 4, 7, 8 et 18. Ann. Inst. Past. 118, 832 (1970)

41). Mécs,E.,J.A.Sonnabend, E.M.Martin,and K.H.Fantes.: The effect of interferon on the synthesis of RNA in chick cells infected with Semliki Forest virus. J. gen. Virol. 1, 25-40 (1967)

42). Mucsi,I., R. Pusztai, I.Béládi and M.Bakay.: Production of high titers of interferon in chick leucocyte cultures inoculated with human adenovirus type 12. Acta Virol. 14, 453 (1970)

43). Norrby, E.: The relationship between the soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. I. Morphologic characteristics. Virology 28, 236 (1966)

44). Norrby, E.: Biological significance of structural adenovirus components. Current Topics Microbiol. Immunol. 43, 1 (1968)

45). Norrby, E.: The structural and functional diversity of adenovirus capsid components. J. gen. Virol. 5, 221-236 (1969)

46). Pusztai,R.,I.Béládi, M.Bakay, and I.Mucsi.: Effect of ultraviolet irradiation and heating on the interferon-inducing capacity of human adenoviruses. J. gen. Virol. 4, 169 (1969)

47). Ratanakrong, N., und R. Wigand.: Die Inaktivierung von Adenovirus-Komponenten durch physikalische und chemische Einflüsse. Z. med. Mikrobiol. u. Immunol. 154, 68-79 (1968)

48). Reichmann,M.E., and R. Stace-Smith.: Preparation of infections ribonucleic acid from potato virus by means of guanidine denaturation. Virology 9, 710-712 (1959)

49). Rowe,W.P.,Huebner,R.J., Gilmore,L.K.,Parrot,R.H and Ward,T.G.: Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 84, 570 (1953)

50). Rowe,W.P.,Huebner,R.J. Gilmore,L.K.,Wadr,T.G. and Parrot, R.H.: Study of the adenoidal-pharyngeal-conjunctival (APC) group of viruses. Amer. J. Hyg. 61, 197 (1955)

51). Russel,W.C., Valentine,R.C., and G.G. Pereira.: The effect of heat on the anatomy of the adenovirus. J. gen. Virol. 1, 509 (1967)

52). Schraff,M.D., J.V.Maizel jr., and L.Levintow.: Physical and immunological properties of a soluble precusor of the Poliovirus capsid. Proc. nat. Acad. Sci., 51, 329-337 (1964)

53). Schlesinger, R. W.: Interference between animal viruses, in " The Viruses ". Vol.III. p. 157-194. Academic Press. (1959)

54). Shu, H. L.: Methode zur Züchtung der embryonalen Zellen. Chinese med. J. 49, 331(1963)

55). Valentine,R.C., and H.G. Pereira.: Antigens and structure of the adenovirus. J. mol. Biol. 13, 13 (1965)

56). Wadell,G., E.Norrby, and U.Schönning.: Ultrastructure of soluble antigens and the virion of adenovirus type 4. Arch. Virusforsch. 21, 234 (1967)

57). Wagner, R. R.: Viral interference. Some considerations of basic mechanism and their potential relationship to host resistence. Bact. Rev. 24, 151-166 (1960)

58). Wagner. R. R.: Biological studies of interferon. I. Suppression of cellular infection with Eastern equine encephalomyelitis virus. Virology 13, 323-337 (1961)

59). Wigand, R.: Serologisch intermediäre Adenovirusstämme. Arch. Virusforsch. 17, 611-618 (1965)

60). Wigand, R.: Serologische Beziehungen der Adenoviren der Gruppe II. Arch. Virusforsch. 23, 40-47 (1968)

61). Wigand, R. und H. Bauer.: Grundlegende Unterschiede in den Eigenschaften der Hämagglutinine verschiedener Adenovirustypen. Zbl. Bakt. 184, 60-65 (1962)

62). Wigand, R. und H.Bauer.: Über den cytopathogenen Effekt der Adenoviren des Menschen. Arch. Virusforsch. 14, 5 (1964)

63). Wigand, R., H. Bauer, E. Lang, and W. Adam.: Neutralisation of the adenoviruses types 1 to 28; Specificity and antigenic relationships. Arch. Virusforsch. 15, 188-199 (1965)

64). Wigand, R. and D. Friedner.: Serologically intermediate adenovirus strains; A regular feature of group II adenoviruses. Arch. Virusforsch. 24, 245-256 (1968)

65). Wigand, R. and M.Stöhr.: The nature of monkey cell haemagglutinins of Rosen's group II adenovirus. Z. Naturforsch. 20b, 559-563 (1965)

66). Wigand, R. and W. Wunn.: Virus-associated and soluble adenovirus haemagglutinins: differences in antigenic specificity. Virology 28, 484-485 (1966)

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. R. Wigand möchte ich hiermit für seine wertvolle Anleitung und Hinweise bei der Durchführung der Arbeit verbindlichst danken.

Mein besten Dank gilt ebenso Herrn Dr. med. Shu für die Überlassung des Arbeitsthema und für seine Hilfe bei der Bewertung der Befunde.

Frau I. Maurer möchte ich für ihre Hilfeleistung bei der Herstellung von Basalmedium und Gewebe-kulturen meinen besten Dank sagen.

Ingo Budiman
6741 Walsheim i. d. Pfalz
Hainbachstr. 2

Lebenslauf

Am 21. November 1937 wurde ich als zweiter Sohn des Kaufmannes Ong Poen Hoen und seiner Ehefrau Oei Kim Soen in Medan, Sumatra, Indonesien geboren.

Nach 6-jähriger Volkschule besuchte ich anschließend die Mittelschule und legte 1954 dort mein Abitur ab. 1955-56 besuchte ich die englische Schule " The Cambridge English School " in Medan bis auf Junior Class. Anschließend ging ich 1957 nach Singapore und studierte dort nach bestandener Aufnahmeprüfung in Nanyang University 5 Semester Physik und Chemie.

1961 kam ich nach 2-jähriger Studiumunterbrechung nach Deutschland, und wurde zum Studium der Medizin an der Universität Hamburg zugelassen. 1965 bestand ich die ärztliche Vorprüfung und besuchte ununterbrochen die klinischen Semester auf der Universität Hamburg, Universität Würzburg und Universität des Saarlandes.

1969 legte ich mein Staatsexamen ab, 1970 erhielt ich die ärztliche Approbation.